

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER
2-METHOXYÖSTROGENE IM MENSCHLICHEN
SERUM UND IM URIN UNTER VERSCHIEDENEN
PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN

REINHARD SONSALLA

1984

*Diss
München*



AUS DER I. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. J. ZANDER

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER 2-METHOXYÖSTROGENE IM
MENSCHLICHEN SERUM UND IM URIN UNTER VERSCHIEDENEN
PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS - UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
REINHARD SONSALLA

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Erich Kuss

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Zander

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1984

Diese Arbeit ist
Herrn Prof. Dr. J. Zander
gewidmet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554004_0102

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. MATERIAL

3. METHODE

3. 1. Einführung

3. 2. Synthese des Antigens; Gewinnung und Charakterisierung des Antikörpers

3. 3. Synthese von 2-Methoxyöstron-17-cmo-¹²⁵J-Histamin

3. 4. Analytik

3.4.1. Vorbereitung der Serumproben

3.4.2. Vorbereitung der Urinproben

3.4.3. Radioimmunoassay

3.4.4. Auswertung

3. 5. Zuverlässigkeit der Methode

3.5.1. Wiederfindung

3.5.2. Leerwerte

3.5.3. Empfindlichkeit

3.5.4. Richtigkeit

3.5.5. Präzision

3.5.6. Spezifität

3.5.7. Praktische Bewährung über eine längere Zeitdauer

3. 6. Leistungsfähigkeit der Methode

4. ERGEBNISSE

5. DISKUSSION

6. ZUSAMMENFASSUNG

7. LITERATURVERZEICHNIS

DANKVERMERK

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

Östradiol-17 β wird im menschlichen Organismus oxydativ metabolisiert. Die wichtigsten Reaktionen sind:

- die (reversible) Dehydrogenierung der Hydroxylgruppe an C17,
- die Hydroxylierung des aliphatischen D-Ringes,
- die Hydroxylierung des aromatischen A-Ringes (15, 29, 56)

Die beiden Hydroxylierungsreaktionen schließen einander offenbar aus; entweder es entsteht das C16-hydroxylierte "Östriol" oder es entstehen die C2- oder C4-hydroxylierten ortho-Diphenole, die sogenannten Catecholöstrogene. Im allgemeinen werden äquimolare Mengen von Östriol und Catecholöstrogenen produziert und ausgeschieden. Bei Adipositas, Hypothyreose und Leberzirrhose steigt die Ring D-Hydroxylierung auf Kosten der Ring A-Hydroxylierung an (28, 30, 59).

Seit einigen Jahren häufen sich Hinweise darauf, daß die Catecholöstrogene nicht nur als Stoffwechselprodukte, als inaktivierte Östradiol mit geringer uterotrophischer Wirkung anzusehen sind (47, 48), sondern daß sie möglicherweise spezifische biologische Funktionen ausüben und besonders am Hypothalamus und an der Hypophyse als Regulatoren der Gonadotropin-Sekretion wirksam sein können. In zahlreichen Arbeiten wurde ihr Einfluß auf die Lutropin- und Prolactin-Freisetzung (2, 3, 31, 32, 35, 36, 48, 49, 54, 55), ihre Wirkung auf das Sexualverhalten (44, 46, 9) und ihre Beteiligung an der Regulation des Cholesterin- und Fettsäure-Stoffwechsels untersucht (18, 45, 50).

Die als ortho-Diphenole sehr reaktionsfreudigen Catecholöstrogene werden auch im menschlichen Organismus durch Methylierung inaktiviert; vom S-Adenosyl-Methionin wird durch das Enzym Catecholmethyltransferase eine Methylgruppe auf eine phenolische Gruppe der Catecholöstrogene übertragen. Auch diese Reaktion kann mit einer physiologischen Wirkung der Catecholöstrogene

zusammenhängen, denn es wurde gezeigt, daß Catecholöstrogene die O-Methylierung der als Neurotransmitter wirksamen Catecholamine kompetitiv hemmen können (8, 17, 40, 41). Mit dieser Konkurrenz der Catecholöstrogene und Catecholamine um das gleiche Enzym sowie mit der ebenfalls nachgewiesenen Produkthemmung der Catecholmethyltransferase-Aktivität durch Methyläther der Catecholöstrogene (16, 41) könnte die in der Gravidität verlängerte hypertone Reaktion nach Noradrenalin-Gabe (20) erklärt werden, da im Serum von Schwangeren die Catecholöstrogene und ihre Methyläther in höheren Konzentrationen vorliegen als im Serum von Nichtschwangeren.

Methyläther der Catecholöstrogene werden vom Testosteron-Östradiol-bindenden Globulin des Serums mit höherer Affinität gebunden als Testosteron und Östradiol (24); die freien Methyläther werden nach enzymatischer Umwandlung zum größten Teil als Sulfate mit dem Urin ausgeschieden, während die Catecholöstrogene größtenteils als Glucuronide im Urin gefunden werden (7, 11).

Frühzeitig wurden Methoden zur quantitativen Bestimmung von Catecholöstrogenen und ihrer Methyläther in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben entwickelt. Ältere Methoden unter Verwendung von Massenspektrometrie, Spektrophotometrie und Gaschromatographie (57, 4, 37, 38, 39) sind inzwischen vollständig durch radioimmunologische Methoden verdrängt.

Während zahlreiche, teilweise sehr widersprüchliche Angaben verschiedener Arbeitsgruppen über die Konzentration von 2-Hydroxyöstrogenen im Serum und Urin vorliegen (58, 42, 6, 14), sind die Berichte über quantitative Bestimmungen von 2-Methoxyöstrogenen sehr spärlich. Über Serum-Konzentrationen berichtete bisher nur eine Arbeitsgruppe, die eine sehr geringe Anzahl von Proben untersucht hatte (25).

Zur Charakterisierung der produzierten und ausgeschiedenen Mengen 2-hydroxylierter Östrogene ist es jedoch notwendig,

auch die Konzentrationen und die Mengen der 2-Methoxyöstrogene in einer hinreichend großen Anzahl von Serum- und Urinproben zu bestimmen. Es war Aufgabe der vorliegenden Arbeit, eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der freien und konjugierten 2-Methoxyöstrogene in Serum und Urin zu entwickeln, Richtigkeit, Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit der Methode zu charakterisieren und mit dieser Methode die Konzentrationen der 2-Methoxyöstrogene unter verschiedenen physiologischen Bedingungen zu messen.

2. MATERIAL

Alle Reagenzien und Lösungsmittel, Reinheitsgrad p. A., wurden, soweit nicht anders angegeben, von E. Merck, Darmstadt bezogen. Diäthyläther (pro narcosi, Hoechst, Frankfurt) wurde nur aus frisch geöffneten Flaschen entnommen.

Sephadex G 25 und LH 20 von Pharmacia (Uppsala, Schweden)

Steroide und markierte Substanzen

2-Methoxyöstron (Sigma Chem. Co. Louis, USA)

2-Methoxyöstradiol-³H (spez. Aktivität 9,2 Ci/mMol) vom Radiochemical Center (Amersham, England) durch katalysierten Austausch mit Tritiumgas hergestellt. Verschiedene Mengen des Tritium - Tracers (2 000 - 10 000 dpm) wurden in je 1 ml Ascorbinsäurepuffer gelöst und in den nachfolgend beschriebenen Radioimmunoassay eingesetzt. Nach der quantitativen Bestimmung von 2-Methoxyöstradiol-³H wurde die spezifische Aktivität des Tracers berechnet.

Na ¹²⁵I (spez. Aktivität 1000 Ci/mMol) und Rinderserumalbumin (BSA) von der Behringwerke AG (Marburg)

Geräte

Automatische Pipetten:

Mikroliterpipetten (Eppendorf, Hamburg)

Finnpipetten (Friedrich & Hoffmann, Gräfelfing)

Dispenser (Swelab, Stockholm)

Zentrifuge Rotanta/S (Hettich, Tuttlingen)

Vortex-Mixer (Bender & Hobein, München)

Thermoblock Dri-Block DB3 Tecam^R (Techna Limited,
Duxford Cambridge, England)

Messung der Radioaktivität

Die ¹²⁵I markierten Proben wurden im Gamma-Zähler

1270 Backgamma LKB gemessen. Die Zählzählbeute betrug 69 %, gezählt wurde eine Minute.

Die Tritium-Messung erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler Modell 2425 der Firma Packard. Die Zählzählbeute betrug 52 %, gezählt wurde zwei Minuten.

Lösungen

Phosphatpufferlösung (pH 7,2):

2,686 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4),
8,356 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und
0,325 g Natriumnitrit (NaN_3) wurden in einem Liter
Aqua pro injectione (B. Braun, Melsungen) gelöst.

Ascorbinsäurepuffer (pH 7,4):

2,24 g Äthylendiamintetraessigsäure, 0,66 g Ascorbinsäure
und 0,3 g Lysozym (Boehringer, Mannheim) wurden in 140 ml
Aqua pro injectione gelöst.

Diese Lösung wurde jeden Tag neu hergestellt und kurz
vor Gebrauch mit ca. 9,6 ml 1 M NaOH auf pH 7,4 titriert.
(Gesamtvolumen 150 ml).

Szintillationslösung:

100 g 2,5-Diphenyloxazol und 1,25 g 1,4-bis-2-
(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (W. Zinsser,
Frankfurt) wurden in 1 l Toluol gelöst. 42 ml dieser
Lösung und 117 ml Bio-Solv (Beckmann Instruments
GmbH, München) wurden mit 1 l Toluol vermischt. Die
Tritium-markierten Proben wurden im Flüssigkeitsszintil-
lationszähler mit 15 ml dieser Lösung gemessen.

Dextran-Kohle-Suspension

0,5 g Norit A (4 - 5 μm ; Serva, Heidelberg) und

0,05 g Dextran T 70 (Pharmacia, Uppsala) wurden in 100 ml Phosphatpuffer (pH 7,2) suspendiert und bei 4° C dauernd gerührt. Die Suspension wurde vor erstmaligem Gebrauch mindestens 24 Stunden gerührt.

Reinigung der Glaswaren

Alle wiederverwendeten Glaswaren wurden nach Gebrauch 24 Stunden in eine RBS - 50 - Lösung (Roth, Karlsruhe) gelegt, mit Wasser gespült, anschließend 24 Stunden in Dichromatschwefelsäure gelegt und zuletzt mit destilliertem Wasser ausgespült und bei 100° C getrocknet.

Biologisches Material

Die Gewinnung der Blutproben erfolgte mittels Armvenenpunktion. Die Bestimmungen im Nabelschnurblut erfolgten nach getrennter Punktion von Arterien und Vene der Nabelschnur unmittelbar post partum. Für die Bestimmungen im Urin wurde ausschließlich Morgenurin verwendet. Blut und Urin wurden sofort zentrifugiert. Da Catecholöstrogene alkali- und oxidationsempfindlich sind (6, 34, 19), wurden Serum und Urin mit 0,2 ml Ascorbinsäurelösung pro ml (3g Ascorbinsäure pro 100 ml Aqua dest) stabilisiert. Die Proben wurden bei -20° C gelagert.

3. METHODE

3.1. Einführung

Die quantitative Bestimmung der 2-Methoxyöstrogene im Serum und im Urin erfolgte mittels einer radioimmunologischen Methode. Das Prinzip des Radioimmunoassays besteht in der Konkurrenz einer bekannten Menge radioaktiv markierten Antigens (Indikatorhapten) und einer unbekannten Menge nicht markierten Antigens (Probe) um die spezifische Bindung an den Antikörper. Als Indikatorhapten wurde 2-Methoxyöstron-17-cmo- ^{125}J -Histamin eingesetzt. Die von anderen Arbeitsgruppen für 2-Methoxyöstrogebestimmungen verwendeten mit Tritium markierten Liganden (10, 25) sind nicht im Handel; ihre Synthesen sind aufwendig und ergeben nur geringe Ausbeuten. Zusätzlich bringen diese Substanzen Probleme bei der Abfallbeseitigung.

^{125}J markierte Radioliganden sind einfacher zu synthetisieren und bieten aufgrund ihrer hohen spezifischen Aktivität den Vorteil großer Empfindlichkeit der Methode, ohne die Spezifität der Hapten-Antikörperreaktion maßgeblich zu beeinträchtigen.

Als Verdünnungsmittel für den Assay wurde Ascorbinsäurepuffer mit einem pH von 7,4 eingesetzt. Unter diesen reduzierenden Bedingungen konnte auch im leicht alkalischen Bereich während des Versuchszeitraums eine oxidative Zersetzung der Catecholöstrogene verhindert werden.

Die Trennung von freiem Antigen von Antigen-Antikörperkomplexen erfolgte mittels Dextrankohle als Adsorptionsmittel. Nach dem Zentrifugieren wurde die Radioaktivität des Überstandes gemessen und der Hormongehalt der Proben durch Vergleich mit der Standardkurve ermittelt.

3.2. Synthese des Antigens; Gewinnung und Charakterisierung des Antikörpers

2-Methoxyöstradiol-17 β -Hemisuccinat wurde wie von Abraham

und Grover beschrieben (1) hergestellt und mittels Dünnschichtchromatographie gereinigt.

Die Kopplung von 2-Methoxyöstradiol-17 β -Hemisuccinat an Rinderserumalbumin (BSA) erfolgte nach Erlanger et al. (26). Das Steroid-Rinderserumkonjugat wurde mittels einer Sephadex G 25 Säule gereinigt. Mit diesem Antigen wurden Kaninchen immunisiert und monatlich geboostert. Drei Monate nach der Erstimmunisierung wurde im Kaninchenserum die Bindung von 2-Methoxyöstron-17-cmo-¹²⁵J-Histamin geprüft. Das Serum, von dem die geringste Menge zur Bindung von 50 % des Radioliganden genügte, wurde charakterisiert und für den Radioimmunoassay verwendet. (Endverdünnung 1 : 240 000)

Die Assoziationskonstante K und die Konzentration der Bindungsstellen q im unverdünnten Antiserum mit 2-Methoxyöstradiol-³H als Radioliganden wurden nach Scatchard (53) berechnet:

$$K = 0,66 \times 10^9 \text{ l/mol} \quad q = 54,3 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$$

Es zeigte sich eine vollständige Kreuzreaktivität zwischen 2-Methoxyöstron und 2-Methoxyöstradiol und eine geringe Kreuzreaktivität mit 2-Methoxyöstriol (1,4 %) und 2-Hydroxyöstron (1,4 %). Andere Steroide zeigten vernachlässigbar kleine Kreuzreaktivitäten von <0,3 % (13).

3.3. Synthese von 2-Methoxyöstron-17-cmo-¹²⁵J-Histamin

1 mCi Na ¹²⁵J (spez. Aktivität 1000 °C/mmol) und 0,73 mg Histamindichlorid in 0,06 ml Phosphatpuffer pH 8 (0,5 molar) wurden zu 0,2 mg Chloramin T in 0,04 ml Aqua dest. gegeben. Nach 60 Sekunden Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,2 mg Na₂ S₂ O₅ in 0,04 ml Aqua dest. gestoppt. 1 mg 2-Methoxyöstron-17-carboxymethyloxim in 0,5 ml Tetrahydrofuran (THF; wasser- und peroxidfrei) wurde auf -10° C mittels einer Eis-Kochsalzmischung abgekühlt. Das gemischte

Anhydrid wurde durch Zugabe von 5 µl Chlorameisensäure-isobutylester und 5 µl Triäthylamin gebildet. Nach 30 Minuten Rühren bei der genannten Temperatur wurde die Jodhistaminlösung zugegeben und das Reaktionsprodukt wurde weitere 3,5 Stunden bei 0° C gerührt. Diese Lösung wurde nach Zugabe von 0,2 ml Essigester mit 1 ml HCl (0,1 molar) angesäuert.

Nicht markiertes Steroid wurde mit 4 x 0,5 ml Essigester extrahiert. Nach Neutralisation der wässrigen Phase mit 0,2 ml NaOH (0,5 molar) und Verdünnung mit 1 ml Phosphatpuffer pH 7 (0,5 molar) wurde das jodmarkierte Indikatorhaptan mit 4 x 0,5 ml Essigester extrahiert.

Eine weitere Reinigung dieses Produktes erfolgte mittels Säulenchromatographie. Der Essigesterextrakt wurde mit Stickstoff eingedampft und in 2 x 0,5 ml Essigsäure/Wasser 9 : 15, dem Elutionsmittel der ersten Säule (Sephadex LH 20, 40 x 1 cm), gelöst und auf die Säule gegeben. Es wurden Fraktionen zu 3 ml gesammelt. Die Fraktionen 30 - 39 ml wurden einrotiert, in 2 x 0,5 ml Benzol/Äthanol/Essigsäure 75 : 24 : 1 gelöst und auf eine Kieselgelsäule (40 x 1 cm) aufgetragen. Die Fraktionen 31 - 46 ml enthielten 2-Methoxyöstron-17-cmo-¹²⁵J-Histamin. Sie wurden gesammelt, einrotiert und in einer Ascorbinsäure/Äthanollösung (100 mg pro 100 ml) bei -18° C aufbewahrt.

3.4. Analytik

3.4.1. Vorbereitung der Serumproben

0,05 - 0,5 ml Serum wurden in jeweils zwei 16 x 100 mm Reagenzgläser pipettiert. Nach Zugabe von 2 ml Diäthyläther wurden die Proben paarweise mit einem Vortex-Mixer

40 sec. geschüttelt. Die wässrige Phase wurde mittels eines Methanol-Trockeneisgemisches (Agefko - Kohlensäure, München) eingefroren. Die Ätherphase wurde in Einmalgläschen (12 x 75 mm) dekantiert. Diese Extraktion wurde einmal wiederholt. Der Ätherextrakt wurde jetzt unter N_2 in einem Thermoblock bei $40^\circ C$ eingedampft und nach dem Trocknen mit 1 ml Ascorbinsäurepuffer gelöst und kurz geschüttelt. Die Gläser blieben abgedeckt mit Silberfolie 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen und wurden danach 10 Minuten mit Ultraschall behandelt.

3.4.2. Vorbereitung der Urinproben

Je 2 x 0,5 ml Urin wurden in Reagenzgläser (16 x 100 mm) pipettiert. Nach Zugabe von 0,1 ml einer frisch hergestellten Hydrolyselösung (0,015 ml $Na_2 S_2 O_5$ (1 %), 0,01 ml H_2O und 0,075 ml konz. HCl (37 %)) wurden die Proben für eine Stunde in ein Wasserbad ($100^\circ C$) gestellt. 0,6 ml Schwangerschaftsurinhydrolysat wurden in zwei Schritten (0,6 ml ad 5,0 ml Ascorbinsäurepuffer und davon 0,01 ml ad 5,00 ml Ascorbinsäurepuffer) verdünnt. 1 ml dieser Verdünnung (0,02 %) wurde direkt im Assay eingesetzt.

Zyklus-, Postmenopausen- und Männerurinproben wurden nach der Hydrolyse analog zu den Serumproben mit 2 x 2 ml Äther extrahiert. Die Proben wurden 2 Minuten bei 3500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um Äther- und Wasserphase zu trennen. Nach Einfrieren der wässrigen Phase wurde der Ätherextrakt dekantiert, eingedampft und in 5 ml Äthanol-Ascorbinsäure (0,1 %) gelöst. 50 μl wurden erneut eingedampft und nach Zugabe von 1 ml Ascorbinsäurepuffer 20 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Zur vollständigen Lösung des Rückstandes wurden die Proben 10 Minuten mit Ultraschall behandelt.

3.4.3. Radioimmunoassay

Für jeden Versuch wurde eine Standardkurve (14, 5,

25, 50, 100, 200 und 400 pg 2-Methoxyöstron; Doppelwerte) angelegt (Abb. 1). Aus einer Stammlösung (0,8 µg/ml in 0,1 %iger Ascorbinsäure/Methanol, aufbewahrt bei -18° C) wurde 0,1 ml entnommen und mit Ascorbinsäurepuffer auf 800 pg/ml verdünnt. Ausgehend von dieser Konzentration wurde eine 1 : 1 Verdünnungsreihe bis 12,5 pg/ml hergestellt; 1 ml der Standardlösung wurde in 12 x 75 mm Reagenzgläser, in denen zuvor 4 ml Diäthyläther bei 40° C unter N₂ eingedampft worden waren, pipettiert.

Zu allen Proben und Standardwerten wurden ca. 8 000 cpm 2-Methoxyöstron-17-cmo-¹²⁵J-Histamin in 0,1 ml Ascorbinsäurepuffer und 0,1 ml des verdünnten Antiserums (Endverdünnung 1 : 240 000) pipettiert. Nach kurzem Schütteln wurden die Gläser - abgedeckt mit Silberfolie - 30 Minuten bei Raumtemperatur und danach 30 Minuten bei 0° C inkubiert. Um das freie Hormon von dem am Antikörper gebundenen zu trennen, wurde in jedes Glas 0,1 ml Dextran-kohlesuspension pipettiert, 5 Sekunden geschüttelt und nochmals 15 Minuten bei 0° C inkubiert, bevor alle Gläser 3 Minuten bei 3500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurden. 1 ml des Überstandes wurde in ein Zählglas pipettiert. Die Radioaktivität wurde im Gamma-Zähler gemessen.

3.4.4. Auswertung

Die vom Gamma-Zähler durch Vergleich mit der Standardkurve ausgerechnete Menge pro Probe wurde nach der Formel

$$\frac{C \times 100}{A \times B} = \text{pg 2-Methoxyöstrogene auf 1 ml Serum oder Urin}$$

umgerechnet.

A = Wiederfindung in %

B = Volumen der Probe in ml

C = Gehalt der Probe an 2-Methoxyöstrogenen

Die Werte im Zyklus-, Postmenopausen- und Männerurin wurden auf 1 mg ausgeschiedenes Kreatinin bezogen (51 b). Es wurden nur Werte zur Berechnung herangezogen, die im Bereich der Standardkurve von 12,5 - 400 pg lagen.

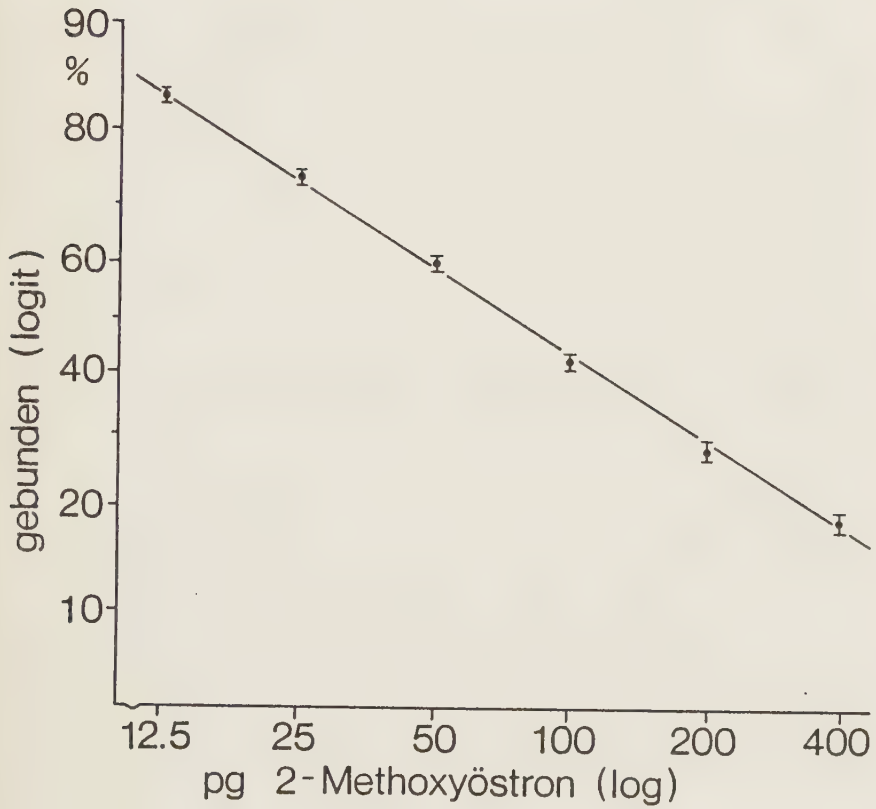


Abb. 1 STANDARDKURVE FÜR 2-METHOXYÖSTRON

3.5. Zuverlässigkeit der Methode

3.5.1. Wiederfindung

Zur Wiederfindung wurden Aliquots eines Postmenopausenserumpools (0,05 - 0,5 ml) bzw. eines Postmenopausenurinpools (0,5 ml) mit 2-Methoxyöstron-³H (10 000 cpm/Probe), wie in 3.4.1. bzw. 3.4.2. beschrieben, vorbereitet. Nach dem Lösen des eingedampften Extraktes in 1 ml Ascorbinsäurepuffer und Zugabe von 15 ml Szintillationslösung wurde die Radioaktivität (cpm) der Proben für die Wiederfindung zusammen mit zwei Kontrollwerten im Szintillationszähler ermittelt. Die Wiederfindung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Mittelwert des wiedergefundenen } ^3\text{H-2-Methoxyöstron (cpm)}}{\text{Mittelwert der Kontrollwerte (cpm)}} \times 100$$

Es errechneten sich folgende Werte:

a) Wiederfindung für die Bestimmung der freien 2-Methoxyöstrogene im Serum:

85,6 ± 1,7 % (Mittelwert ± SD; 0,05 - 0,1 ml Serum; n = 22)

77,8 ± 2,9 % (Mittelwert ± SD; 0,5 ml Serum; n = 22)

b) Wiederfindung für die Bestimmung von konjugierten 2-Methoxyöstrogenen im Urin:

85,3 ± 1,3 % (Mittelwert ± SD; 0,5 ml Urin; n = 20)

3.5.2. Leerwerte

Wasserproben (0,05 - 0,5 ml) wurden, wie für Serum und Urin beschrieben, bei jedem Versuchsansatz extrahiert und gemessen. Zusätzlich wurde bei allen Urinbestimmungen der Urin eines 5jährigen Knaben mitbestimmt.

Es ergaben sich folgende Werte:

a) Serumbestimmung:

0,05 - 0,5 ml H₂O : $1,81 \pm 2,71$ pg/Probe n = 56

b) Urinbestimmung:

0,5 ml H₂O : $0,10 \pm 0,39$ pg/Probe n = 34

0,5 ml Kinderurin : $2,10 \pm 0,64$ pg/Probe n = 34

Signifikante Unterschiede vom H₂O-Leerwert ergaben sich nicht, wenn mit Dextrankohle behandeltes Männerserum gemessen wurde.

3.5.3. Empfindlichkeit

Je geringer die Konzentration eines Stoffes ist, die noch von Null bzw. vom Leerwert unterschieden werden kann, desto empfindlicher ist eine Methode (52 a). Der Leerwert für die einfache Extraktion betrug $1,81 \pm 2,71$ pg pro Ansatz und für die Extraktion nach der Hydrolyse $0,1 \pm 0,39$ pg pro Ansatz. Unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Wiederfindung von 85,6 % bzw. 85,3 % errechnet man mit der vorgegebenen statistischen Sicherheit von 95 % (entspricht der doppelten Standardabweichung) die geringsten noch nachweisbaren Konzentrationen zu 16,9 pg/ml für die Bestimmung der freien 2-Methoxyöstrogene im Serum, bzw. 206,3 pg/ml für die Bestimmung der konjugierten 2-Methoxyöstrogene im Urin, wenn man von einem Probenvolumen von 0,5 ml Serum bzw. 0,005 ml Urin ausgeht.

3.5.4. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde durch Zusatzversuche mit 2-Methoxyöstron beurteilt. 20, 40, 50, 80, 100, 160, 200

und 320 pg 2-Methoxyöstron wurden 0,05 - 0,5 ml eines Männerserumpools zugesetzt. Aus den ermittelten Einzelbestimmungen wurden nach Abzug des Serumleerwertes Mittelwert und Standardabweichung berechnet und in ein Koordinatensystem eingetragen (Abb. 2). Auf der x-Achse sind die erwarteten, auf der y-Achse die beobachteten Werte eingezeichnet. Die Beziehung zwischen erwarteten und beobachteten Werten wurde statistisch durch die Berechnung der Regressionsgleichung erfaßt. Analog wurde mit Zusatz von 50, 100, 200 und 400 pg 2-Methoxyöstron zu Kinderurin verfahren.

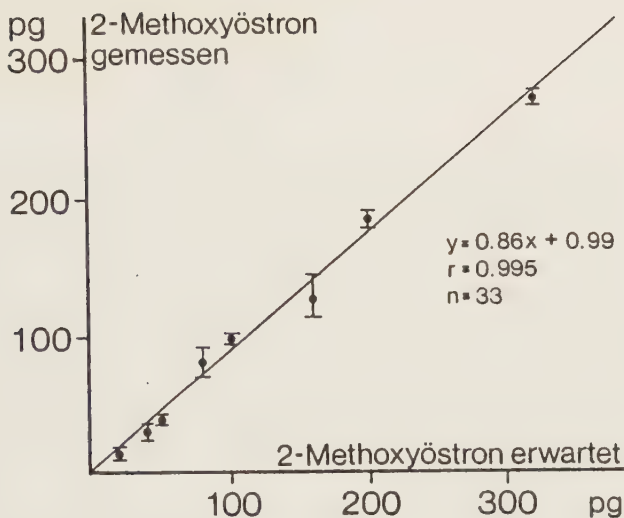
Die Regressionsanalyse, 2-Methoxyöstron gemessen (Y) aufgetragen gegen 2-Methoxyöstron erwartet (X), ergab folgende Gleichungen:

$$y = 0,86x + 0,99 \text{ mit einem Korrelationskoeffizienten}$$
$$r = 0,995 \text{ für die Bestimmung im Serum}$$

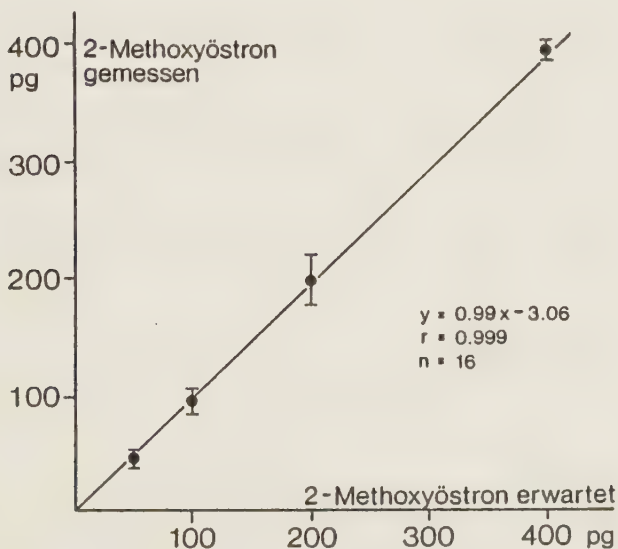
und

$$y = 1,03x + 2,12 \text{ mit einem Korrelationskoeffizienten}$$
$$r = 0,999 \text{ für die Bestimmung im Urin.}$$

Die ermittelten Konzentrationen an 2-Methoxyöstron wurden von der Serummenge (0,05 - 0,5 ml), aus der extrahiert wurde, nicht signifikant beeinträchtigt.



a) FREIE 2-METHOXYÖSTROGENE IM SERUM



b) KONJUGIERTE 2-METHOXYÖSTROGENE IM URIN

Abb. 2 RICHTIGKEIT DER METHODE, KORRELATION VON ERWARTETEN UND GEMESSENEN WERTEN (2-METHOXYÖSTRON)

3.5.5. Präzision

Die Präzision der Methode wurde aus der Abweichung der Resultate innerhalb eines Versuchsansatzes (Repetierbarkeit) und aus der Abweichung der Messergebnisse der gleichen Proben in verschiedenen Versuchsansätzen (Reproduzierbarkeit) ermittelt (51 a). Für die Repetierbarkeit ergab sich bei 14facher Doppelbestimmung eines Poolserums, das 78 pg/ml 2-Methoxyöstrogene enthielt, ein Variationskoeffizient von 6,5 %.

Für die Reproduzierbarkeit ergab sich bei 56 Doppelbestimmungen eines Schwangerschaftsserumpools, in dem 3,2 ng/ml 2-Methoxyöstrogene enthalten waren, ein Variationskoeffizient von 9,1 %.

Im Urin ergab sich für die Repetierbarkeit bei 10facher Doppelbestimmung eines Poolurins, der 7,9 ng/ml 2-Methoxyöstrogene enthielt, ein Variationskoeffizient von 2,6 %.

Für die Reproduzierbarkeit errechnete sich bei 17 Doppelbestimmungen eines Schwangerschaftsurins, der 330,5 ng/ml 2-Methoxyöstrogene enthielt, ein Variationskoeffizient von 4,2 %.

Der Variationskoeffizient wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Variationskoeffizient (in \%)} = \frac{s/\bar{x}}{\sqrt{n-1}} \times 100$$

s = Standardabweichung

$\bar{x}$ = Mittelwert

n = Anzahl der Doppelbestimmungen

3.5.6. Spezifität

Nach Rick (52 a) gilt eine Methode als spezifisch, wenn nur ein Stoff in der Messreaktion erfaßt wird.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Spezifität der Methode war durch die Verwendung der spezifisch bindenden Antikörper gewährleistet (s. Kapitel 3.2.). Zusätzlich wurde die Spezifität durch Einführung eines chromatographischen Reinigungsschrittes geprüft.

12 Proben eines Zyklusurinpools wurden in üblicher Weise hydrolysiert, extrahiert, eingedampft und in 5 ml Äthanol/Ascorbinsäure gelöst. Aliquots dieser Lösungen (50 µl) wurden nach Zusatz von Tritium markiertem 2-Methoxyöstron (30 pg; 1000 cpm) erneut eingedampft.

6 Aliquots wurden ohne weitere Reinigung radioimmunologisch bestimmt, die anderen Proben wurden in je 100 µl Benzol/Methanol 9:1 gelöst und durch Säulenchromatographie (Sephadex LH 20, 10 x 1 cm; Benzol/Methanol 9:1) gereinigt. Die Fraktionen 4 bis 8 ml, die 2-Methoxyöstron enthielten, wurden aufgefangen und unter Stickstoff getrocknet. Die Rückstände aller Proben wurden in 1,3 ml Ascorbinsäurepuffer gelöst. 2 x 100 µl der Lösungen dienten zur radioaktiven Wiederfindungsbestimmung, jeweils 1000 µl wurden im Radioimmunoassay eingesetzt.

Die Ergebnisse dieser vergleichenden Bestimmungen finden sich in Tabelle 1.

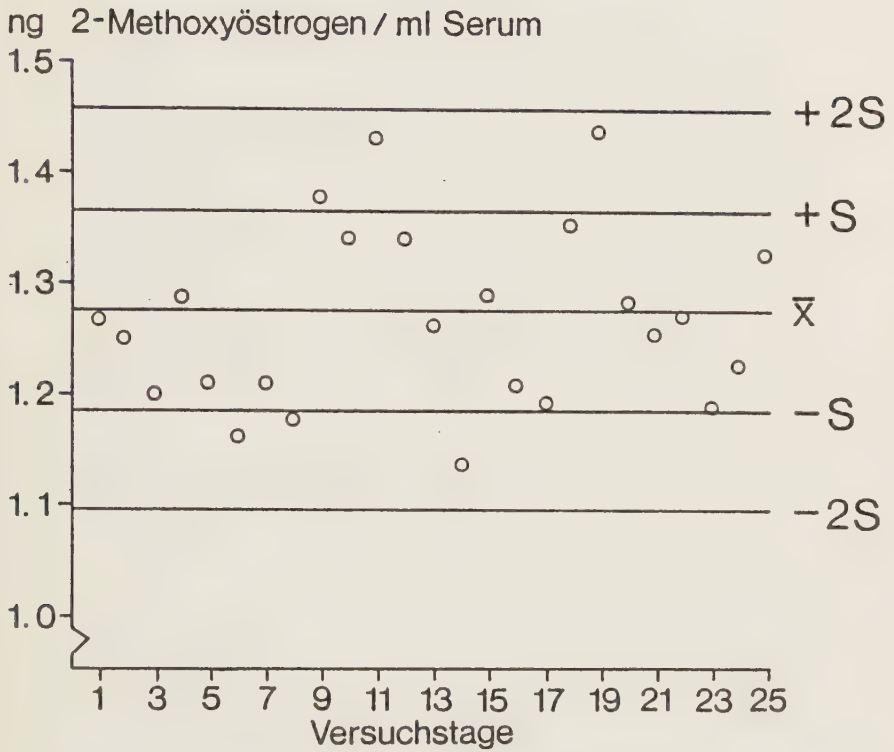
Tabelle 1 Vergleichende Bestimmung von 2-Methoxyöstrogenen

	mit Säulenchromatographie	ohne Säulenchromatographie
$\bar{x} \pm SD$ (ng/ml)	18,61 $\pm$ 2,57	22,63 $\pm$ 1,65
Vk in %	6,1	3,3
n	6	6

3.5.7. Praktische Bewährung über eine längere Zeitdauer

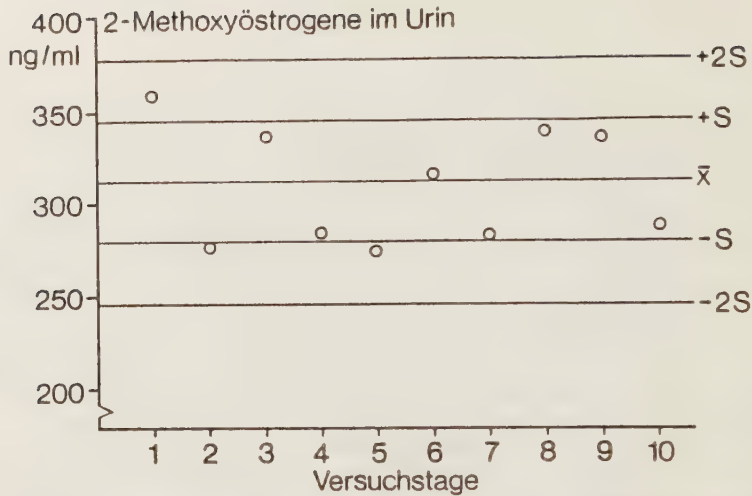
Die Zuverlässigkeit einer Methode wird auch von ihrer praktischen Bewährung über einen längeren Zeitraum bestimmt. Zur fortlaufenden Kontrolle des RIA wurden deshalb 0,1 ml eines gepoolten Schwangerschaftsserums in einer Doppelbestimmung bei jedem Versuchsansatz mitbestimmt. Analog wurde mit jeweils 0,5 ml eines Schwangeren- und eines Zyklusurinpools verfahren. Die Werte der ersten 10 Bestimmungen wurden zur Berechnung von Mittelwert und einfacher und doppelter Standardabweichung herangezogen und in ein Kontrollblatt eingetragen. (Abb. 3a, b, c). Die Methode ist unter Kontrolle, wenn 66 % der Werte im Bereich $\bar{x} \pm 1s$ liegen (51 a).

Aus den angefertigten Kontrollblättern geht hervor, daß während der aufgetragenen Versuchsabschnitte alle Kontrollbestimmungen innerhalb des Bereiches $\bar{x} \pm 2s$ lagen.



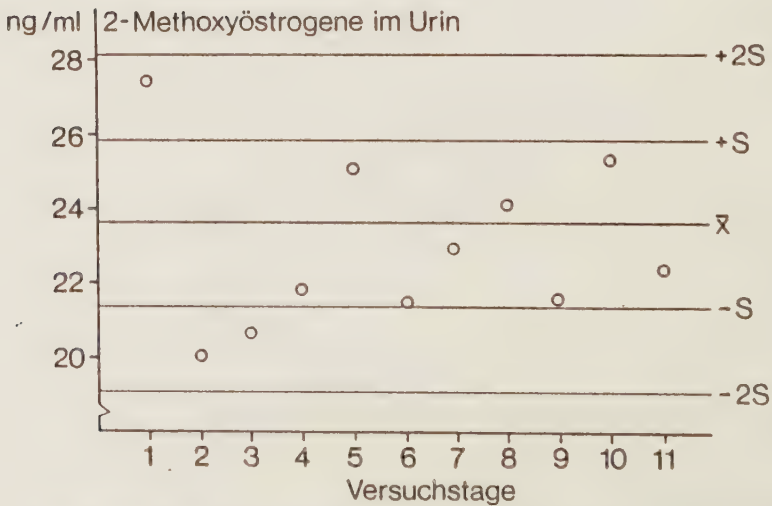
$\bar{x}$ - Mittelwert des Kontrollserums S - Standardabweichung

Abb. 3a KONTROLLBLATT FÜR SERUMBESTIMMUNGEN



$\bar{x}$ = Mittelwert des Kontrollserums S = Standardabweichung

Abb. 3b KONTROLLBLATT FÜR SCHWANGERSCHAFTSURINBESTIMMUNG



$\bar{x}$ = Mittelwert des Kontrollserums S = Standardabweichung

Abb. 3c KONTROLLBLATT FÜR ZYKLUSURINBESTIMMUNG

3.6. Leistungsfähigkeit der Methode

Mit der beschriebenen Methode können 20 Proben (Doppelbestimmungen) zusammen mit einer Standardkurve aus 9 Doppelwerten von einer Arbeitskraft in einem Versuchsansatz bestimmt werden. Der Zeitaufwand beträgt für die Bestimmung der freien 2-Methoxyöstrogene ca. 5 Stunden und für die Bestimmung konjugierter 2-Methoxyöstrogene einschließlich Hydrolyse und Extraktion ca. 8 Stunden.

Limitiert wird die Probenzahl durch die Kapazität des Thermoblocks beim Eindampfen und durch die manuelle Belastung, die während der Extraktion beim Schütteln der Proben mittels des Vortex-Mixers auftritt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Bestimmung von freien 2-Methoxyöstrogenen im Serum ($M \pm SD$)

4.1.1. Die Bestimmung von 25 Männerseren (Alter 19 - 78 Jhr) ergab einen Mittelwert von $< 16,9$ pg/ml.

4.1.2. Im Serum von 10 Frauen in der Postmenopause wurde eine Konzentration von 37 ± 17 pg/ml ermittelt.

4.1.3. Bei 25 Seren von Frauen in der Follikelphase des Menstruationszyklus (2. - 10. Tag) wurden 47 ± 13 pg/ml gemessen.

4.1.4. In der Lutealphase des Menstruationszyklus (20. - 28. Tag) wurde in 25 Seren ein Gehalt von 72 ± 15 pg/ml gemessen.

4.1.5. Abb. 4 zeigt den mittleren Konzentrationsverlauf im Serum von 8 Frauen während des Menstruationszyklus bezogen auf den LH-Gipfel.

4.1.6. Die Ergebnisse der 2-Methoxyöstrogenbestimmung im Serum während der Schwangerschaft sind in Tab. 2 und Abb. 5 dargestellt.

4.1.7. Abb. 7 und 8 zeigen den Konzentrationsverlauf von freien 2-Methoxyöstrogenen im Serum von 2 Frauen während der Schwangerschaft.

4.1.8. In Tab. 3 findet sich eine Gegenüberstellung der Meßergebnisse von 28 Serumproben von Müttern am Termin und den zugehörigen Neugeborenen. Als Median ergab sich ein Wert von $3\ 275$ pg/ml bei einem Bereich von $1\ 432 - 6\ 379$ pg/ml für die Seren von Müttern am Termin. Bei den Neugeborenen-seren ergab sich als Median ein Wert von $1\ 359$ pg/ml (Bereich $533 - 2\ 487$ pg/ml)

4.1.9. Von fünf Neugeborenen wurde der Gehalt an freien

2-Methoxyöstrogener in den Nabelschnurvenen und -arterien gemessen.

	Median pg/ml	Bereich pg/ml	n
V. umbilicalis	740,9	406,5 - 1 178,7	5
A. umbilicalis	345,9	279,3 - 457,6	8

Von 2 Neugeborenen stand nur das Serum einer Arterie zur Verfügung.

4.2. Bestimmung der konjugierten 2-Methoxyöstrogener im Urin (M $\pm$ SD)

4.2.1. Im Urin von 10 Männern (Alter 22 - 64 Jhr) wurden im Mittel $3,84 \pm 1,17$ ng/mg ausgeschiedenes Kreatinin ermittelt.

4.2.2. Die Bestimmung von 10 Urinproben von Frauen in der Postmenopause ergab einen Mittelwert von $5,13 \pm 1,65$ ng/mg Kreatinin.

4.2.3. Bei 78 Urinproben von Frauen in der Follikelphase des Menstruationszyklus wurden $6,87 \pm 1,92$ ng/mg Kreatinin gemessen.

4.2.4. In der Lutealphase des Menstruationszyklus wurde bei 92 Urinproben ein Gehalt von $9,3 \pm 3,51$ ng/mg Kreatinin an konjugierten 2-Methoxyöstrogenen ermittelt.

4.2.5. Abb. 4 zeigt den mittleren Konzentrationsverlauf im Urin von 5 Frauen während des Menstruationszyklus bezogen auf den LH-Gipfel.

4.2.6. Die Ergebnisse der Bestimmung während der Schwangerschaft werden in Tab. 2 und Abb. 6 dargestellt.

4.2.7. Abb. 7 und 8 zeigen den Konzentrationsverlauf konjugierter 2-Methoxyöstrogener im Urin von 2 Frauen während der Schwangerschaft.

Tabelle 2 Ergebnisse der 2-Methoxyöstrogenbestimmung
während der Schwangerschaft

Median, (10. und 90. Perzentile)

SSW	freie 2-Methoxy- östrogene im Serum	n	konjugierte 2-Methoxyöstrogene im Urin	n
	pg/ml		ng/mg Kreatinin	
9. - 12.	460(239 - 1169)	37	45,1(18,1 - 87,7)	9
13. - 16.	949(399 - 1601)	24	89,6(30,6 - 167,2)	21
17. - 20.	1234(705 - 2147)	15	118,5(47,4 - 256,1)	25
21. - 24.	3001(939 - 4260)	13	134,0(54,6 - 366,7)	11
25. - 28.	3079(1167 - 5557)	20	166,0(70,1 - 350,0)	16
29. - 32.	2816(1638 - 6451)	24	138,8(66,7 - 351,6)	14
33. - 36.	3116(1772 - 6802)	22	131,6(74,7 - 388,6)	14
37. - 40.	3624(2218 - 6334)	34	167,5(78,8 - 344,6)	23

Tabelle 3 Vergleich der Konzentrationen von maternem und fetalen Seren am Termin.

freie 2-Methoxyöstrogene im Serum pg/ml Median und Bereich	
Mutter a. T.	Neugeborenes
1 432	533
1 534	575
1 697	658
1 945	674
2 024	717
2 137	785
2 463	911
2 475	951
2 480	1 061
2 855	1 098
2 894	1 120
2 966	1 124
3 079	1 175
3 224	1 199
3 326	1 518
3 453	1 657
3 580	1 679
3 836	1 687
3 887	1 720
3 977	1 729
3 993	1 778
4 141	1 821
4 213	1 855
4 239	1 915
4 564	1 921
4 802	2 101
5 220	2 208
6 379	2 487
Median 3 275 pg/ml	Median 1 359 pg/ml
Bereich (1 432 - 6 379 pg/ml)	Bereich (533 - 2 487 pg/ml)
n = 28	n = 28

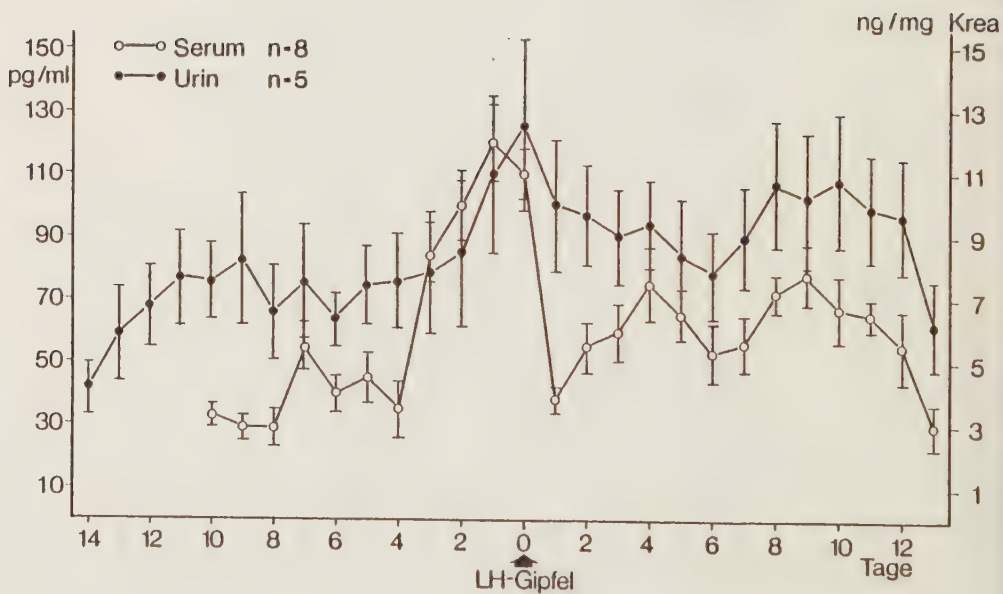


Abb. 4 2-METHOXYÖSTROGENKONZENTRATIONEN WÄHREND
 DES MENSTRUATIONSZYKLUS ($M \pm SEM$)

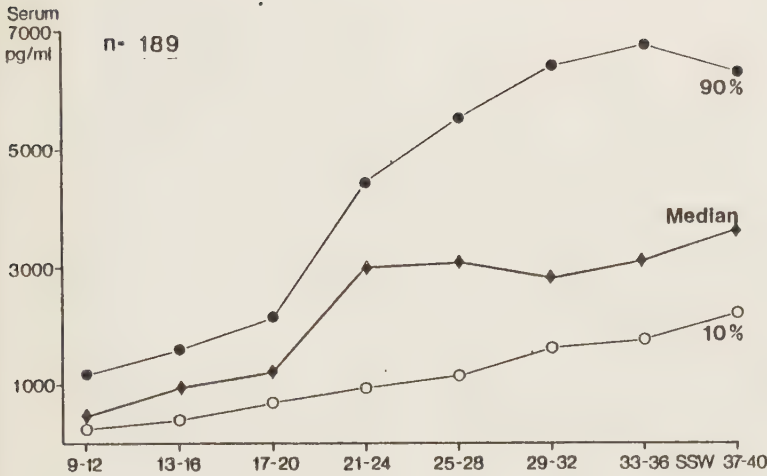


Abb. 5 KONZENTRATION FREIER 2-METHOXYÖSTROGENE IM SERUM
WÄHREND DER SCHWANGERSCHAFT
MEDIAN, 10. UND 90. PERCENTILE

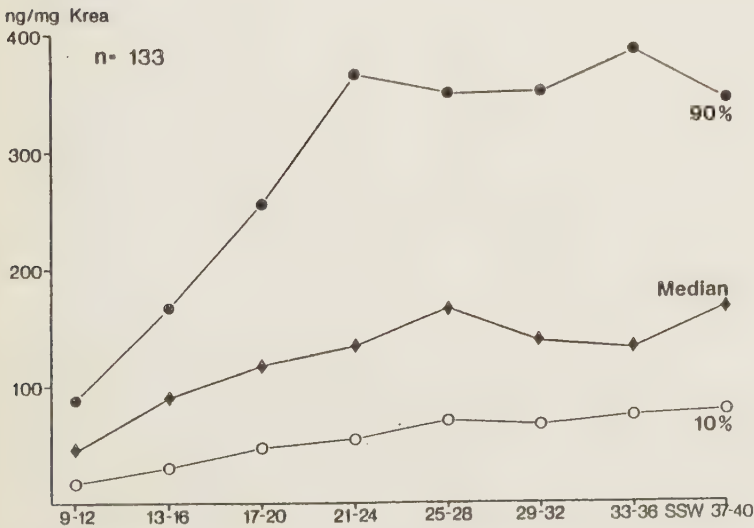


Abb. 6 KONZENTRATION KONJUGIERTER 2-METHOXYÖSTROGENE IM URIN
WÄHREND DER SCHWANGERSCHAFT
MEDIAN, 10. UND 90. PERCENTILE

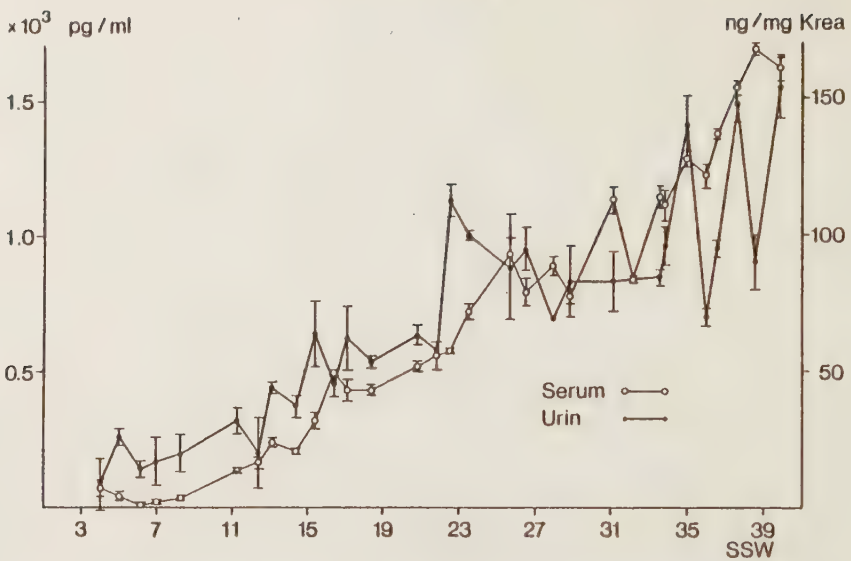


Abb. 7 VERLAUFSBEOBACHTUNG DER 2-METHOXYÖSTROGENKONZENTRATIONEN
BEI DER SCHWANGEREN A. G.

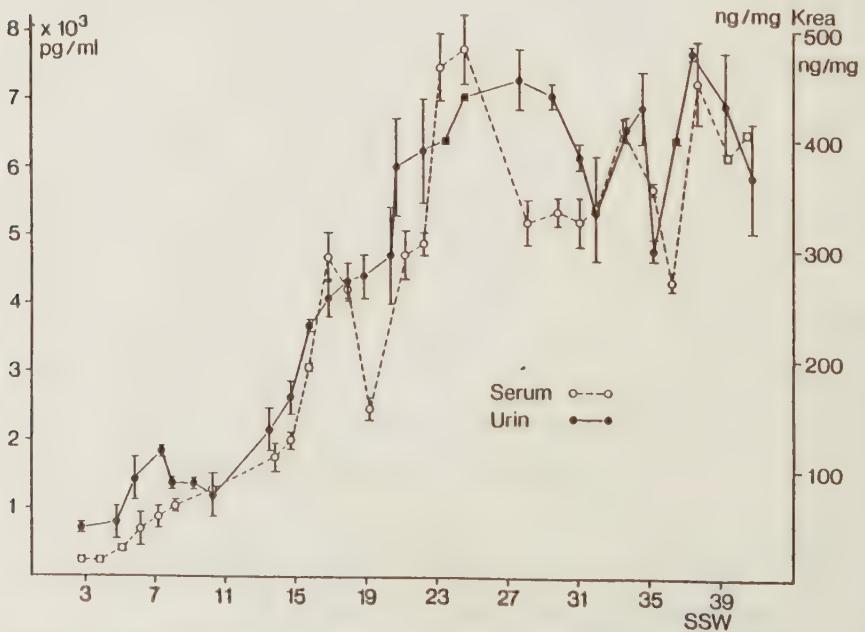


Abb. 8 VERLAUFSBEOBACHTUNG DER 2-METHOXYÖSTROGENKONZENTRATIONEN
BEI DER SCHWANGEREN B. C.

5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden 2-Methoxyöstrogenkonzentrationen im Serum und im Urin mit einer radioimmunologischen Methode bestimmt. Bei den bisherigen Bestimmungen von 2-Methoxyöstrogenen mittels Radioimmunoassay (25, 10) wurden tritiummarkierte Liganden verwendet, die nicht im Handel sind und Probleme bei der Abfallbeseitigung mit sich bringen. In dieser Arbeit wurden ^{125}J markierte Radioliganden eingesetzt, die aufgrund ihrer hohen spezifischen Aktivität eine höhere Empfindlichkeit der Methode ermöglichen, ohne die Spezifität der Hapten-Antikörperreaktion maßgeblich zu beeinträchtigen. Eine Verbesserung der Empfindlichkeit wurde zusätzlich dadurch erreicht, daß im Immunogen das Steroid über ein anderes Brückenglied als im Indikatorhapten gebunden wurde. Als Immunogen wurde 2-Methoxyöstradiol-17 β -Hemisuccinat-BSA eingesetzt; als Indikator wurde 2-Methoxyöstradiol-17-cmo- ^{125}J -Histamin verwendet. Die Standardkurven von 12,5 - 800 pg weisen die hohe Empfindlichkeit des Systems nach (50 %ige Verdrängung des Indikatorhaptens durch 75 pg 2-Methoxyöstron) (13). Es sind somit die Voraussetzungen gegeben, physiologische Konzentrationen an 2-Methoxyöstrogenen im Serum und im Urin auch außerhalb der Schwangerschaft in kleinen Probenvolumina exakt zu erfassen. Um einen weiteren Hinweis auf die Spezifität der Methode zu erhalten wurden 2-Methoxyöstradiol und andere eventuell kreuzreagierende Metaboliten und Störfaktoren von 2-Methoxyöstron mittels Säulenchromatographie (Sephadex LH 20) getrennt. Die nach dieser Reinigung in 6 Proben eines Zyklusurinpools ermittelten 2-Methoxyöstrogenwerte waren im Mittel um ca. 18 % niedriger als die Vergleichswerte. Dieser Verlust entspricht in etwa der Menge an abgetrenntem 2-Methoxyöstradiol das im Verhältnis zum ausgeschiedenen konjugierten 2-Methoxyöstron im Bereich von 10 - 20 % liegt (10). Die Variationskoeffizienten liegen mit 5,1 % für die Bestimmung mit und 3,3 % für die Bestimmung ohne chromatographischen Reinigungsschritt in dem für die Präzision eines RIA geforderten Bereich.

Zur Extraktion der Serum- und Urinproben wurde Diäthyläther eingesetzt. Neben niedrigen Reagenzienleerwerten ergab sich eine hohe und konstante Wiederfindung von $85,6 \pm 1,7 \%$ bzw. $85,3 \pm 1,3 \%$. Die Urinproben mußten bei der Bestimmung der konjugierten 2-Methoxyöstrogene nach der Extraktion zwei Minuten zentrifugiert werden, um die Ätherphase von der wässrigen Phase zu trennen. Selbst nach dem Zentrifugieren gab es vereinzelt Proben, bei denen eine Trennung der Phasen nicht möglich war, und die somit nicht für die Bestimmung eingesetzt werden konnten.

In den Reagenzgläsern für die Standardkurve wurden vor Zugabe der einzelnen Verdünnungen 4 ml Diäthyläther unter N_2 eingedampft. Es ergab sich ein Leerwert von $1,81 \pm 2,71$ pg pro Ansatz für die Bestimmung der freien 2-Methoxyöstrogene. Daraus folgt unter Berücksichtigung von Wiederfindung und eingesetztem Serumvolumen eine untere Nachweisbarkeitsgrenze von 16,9 pg/ml. Die Konzentrationen der freien 2-Methoxyöstrogene liegen während des Menstruationszyklus, in der Schwangerschaft und in der Postmenopause über dieser Nachweisgrenze.

Bei der Bestimmung der konjugierten 2-Methoxyöstrogene im Urin, die wegen der Hydrolyse und wegen des zweimaligen Eindampfens zeit- und arbeitsaufwendiger war, ergab sich ein Leerwert von $0,1 \pm 0,39$ pg pro Ansatz. Hieraus errechnet sich bei einer Wiederfindung von 85,3 % eine Grenze der Nachweisbarkeit von 200 pg/ml. Die Konzentrationen in allen Urinproben liegen über der Nachweisgrenze der Methode.

Für die Reproduzierbarkeit, ermittelt aus der täglichen Messung einer Kontrollprobe, ergab sich bei der Bestimmung im Serum ein Variationskoeffizient von 9,1 % bzw. von 4,2 % bei der Urinbestimmung.

Die Richtigkeit der Methode wurde durch Zusatzversuche von kaltem 2-Methoxyöstron zu Männerserum und Kinderurin bestätigt. Die enge Beziehung von zugesetztem und gemessenem 2-Methoxyöstron zeigt sich in den Regressionsanalysen, die für die Bestimmung im Serum einen Korrelationskoeffizienten von

0,995 und für die Urinbestimmung den Korrelationskoeffizienten von 0,999 ergeben (Abb. 2).

Um eine Aussage über die praktische Bewährung der Methode während einer längeren Zeitdauer machen zu können, wurden in einer Pilotphase von 10 Versuchstagen 0,1 ml eines gepoolten Schwangerschaftsserums in einer Doppelbestimmung bei jedem Versuchsansatz mitbestimmt. Die ermittelten Werte wurden zur Berechnung von Mittelwert und einfacher und doppelter Standardabweichung herangezogen und in ein Kontrollblatt eingetragen (Abb. 3a). Analog wurde bei der Schwangerschafts- und Zyklusurinbestimmung verfahren (Abb. 3b,c). Es lagen mindestens 70 % der Werte innerhalb von Mittelwert $\pm$ einer Standardabweichung und alle Werte innerhalb des Vertrauensbereiches von Mittelwert $\pm$ zwei Standardabweichungen.

Ausgedehnte zusätzliche Reinigungsschritte bei der Aufarbeitung der Urinproben (Säulenchromatographie, Waschen mit Natronlauge und wässriger Essigsäure (10)) wurden in dieser Arbeit nicht vorgenommen.

24 Stunden Urinsammlungen sind, besonders wenn sie ambulant durchgeführt werden, notorisch unzuverlässig. Die Kreatininurie ist bei normaler Nierenfunktion direkt der Muskelmasse proportional und unabhängig von der physischen Belastung von Stunde zu Stunde auffallend konstant (51 b). Deswegen wurden die im Morgenurin gemessenen Hormonkonzentrationen auf ein Milligramm ausgeschiedenes Kreatinin bezogen.

Zum Vergleich mit den von anderen Autoren (10, 4, 39, 21) angegebenen Werten im 24-Stunden-Urin (Tab.5) wurde eine mittlere Kreatininausscheidung von 1,6 g pro Tag beim Mann und 1,2 g pro Tag bei der Frau angenommen (51 b).

Für die einzelnen Meßwerte im Serum und im Urin während der Schwangerschaft war weder eine Normal- noch eine log- Normalverteilung nachweisbar. Zur Darstellung dieser Ergebnisse in

Abb. 5 und Abb. 6 wurde ein parameterfreies Verfahren herangezogen, das den Median der Werte und den Bereich zwischen der zehnten und der neunzigsten Percentile erfaßt (52 b).

Über 2-Methoxyöstrogene im Plasma liegt bisher nur eine Arbeit vor (Emons et al. (25); Tab. 4). Die Autoren fanden bei Männern und bei Frauen in der Follikelphase und in der Postmenopause etwa gleich hohe 2-Methoxyöstrogenkonzentrationen.

Auch bei der Bestimmung der freien 2-Hydroxyöstrogene, den direkten Vorläufern der 2-Methoxyöstrogene, fanden Berg et al. (14) ungefähr gleich hohe Serumkonzentrationen bei Männern und bei Frauen in der Follikelphase (Tab. 4). Über die Serumkonzentrationen der 2-Hydroxyöstrogene während des Zyklus liegen widersprüchliche Angaben vor (58, 6, 41, 14). Die von Berg et al. (14) ermittelten Werte liegen um ca. 30 % niedriger als die in dieser Arbeit ermittelten freien 2-Methoxyöstrogenkonzentrationen.

In dieser Arbeit konnten bei der Bestimmung von 25 Seren von Männern im Alter von 19 - 78 Jahren keine freien 2-Methoxyöstrogene ermittelt werden. Die von Emons et al. (25) gemessenen Serumkonzentrationen während des Zyklus sind etwa doppelt so hoch wie die in dieser Arbeit ermittelten Werte.

Ball et al. (10) fanden im Männerurin höhere 2-Methoxyöstrogenkonzentrationen als bei Frauen in der Postmenopause. Die von ihnen bestimmten Werte während des Menstruationszyklus liegen um ca. 50 % höher als die in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationen. Im Männerurin fanden sich in der vorliegenden Arbeit etwa gleich hohe Konzentrationen wie bei Frauen in der Postmenopause.

Abb. 4 veranschaulicht den Konzentrationsverlauf der 2-Methoxyöstrogene während des Menstruationszyklus. Bei den Wer-

ten im Serum zeigt sich ein deutlicher praeovulatorischer Gipfel. Einen Tag später findet sich im Urin der höchste Wert zusammen mit dem LH-Gipfel.

Bei der Bestimmung der freien 2-Methoxyöstrogenkonzentrationen in der Schwangerschaft fanden Emons et al. (25) zwischen der 21. und 30. Schwangerschaftswoche ca. fünfundzwanzigmal höhere Werte als in der Lutealphase (Tab. 4). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte ergeben für diesen Zeitraum ca. vierzigmal höhere Konzentrationen als in der Lutealphase. Die Konzentration der freien 2-Methoxyöstrogene steigt bis zum Ende der ersten Schwangerschaftshälfte sehr viel steiler an als in der zweiten Hälfte (Abb. 5). Östron und die 2-Hydroxyöstrogene zeigen einen ähnlichen Verlauf (27, 14).

Bei der Verlaufsbeobachtung zweier Schwangerschaften zeigt sich ein relativ deutlicher Konzentrationsanstieg um die 23. Woche (Abb. 7 u. 8). Während sich bei der Schwangeren A.G. gerade in den letzten vier Wochen ein erheblicher Konzentrationsanstieg beobachten läßt, übersteigt bei der Schwangeren B.C. die 2-Methoxyöstrogenkonzentration den um die 25. Woche erreichten Wert nicht mehr. Vergleichswerte über den Konzentrationsverlauf von freien 2-Methoxyöstrogenen liegen in der Literatur nicht vor.

In Tab. 3 werden 2-Methoxyöstrogenwerte von 28 Nabelschnurseren und die entsprechenden Werte im mütterlichen Serum aufgeführt. In den Nabelschnurseren zeigen sich im Schnitt 60 % niedrigere Werte als in den Seren von Müttern unter der Geburt. Ein ähnliches Verhältnis wird von Adlercreutz et al. (4) für gepooltes Nabelschnur- und Mutterserum angegeben. Berg et al. (14) fanden im mütterlichen Serum deutlich niedrigere freie 2-Hydroxyöstrogenkonzentrationen als im Nabelschnurserum. Ursächlich könnte dafür eine geringere Aktivität der fetalen Erythrocyten- oder Leber-Catecholmethyltransferase oder eine höhere Demethylierungs- und Konjugationsrate der fetoplazentaren Einheit verantwortlich sein. Die verglei-

gehende Bestimmung von freien 2-Methoxyöstrogenen im Serum von 5 Nabelschnurvenen und den dazugehörigen Nabelschnurarterien ergab im Schnitt um 55 % niedrigere Werte für die Nabelschnurarterien. Dieser Konzentrationsunterschied könnte durch die Konjugation in der fetalen Leber und die anschließende Dekonjugation in der Placenta bedingt sein (23).

Über 2-Methoxyöstrogenkonzentrationen im Urin wird in der Literatur von verschiedenen Autoren berichtet. Ball et al. (10) und Hobkirk et al. (39) fanden bis zur 40. Schwangerschaftswoche ansteigende Konzentrationen. Dieses Ergebnis konnte von Hobkirk et al. (39) bei der Verlaufsbeobachtung von vier Schwangerschaften nicht bestätigt werden. Nur während einer Schwangerschaft stieg die 2-Methoxyöstrogenkonzentration bis zum Ende kontinuierlich an. Drei Schwangerschaften zeigten im letzten Trimenon keinen weiteren Konzentrationsanstieg mehr im Gegensatz zu den Gesamtöstrogenen, die bei allen untersuchten Schwangerschaften bis zum Termin kontinuierlich anstiegen.

In dieser Arbeit ließ sich bei der Bestimmung des Gesamtkollektivs im letzten Trimenon kein Konzentrationsanstieg ermitteln (Tab 5; Abb. 6). Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Fischer-Rasmussen (27) und Adlercreutz et al. (4) angegebenen Konzentrationsverlauf von Östron überein. Gelbke et al. (33) konnten auch für 2-Hydroxyöstron in der zweiten Schwangerschaftshälfte keinen weiteren Anstieg im Urin ermitteln.

Die Verlaufsbeobachtung zweier Schwangerschaften (Abb. 7 u. 8) erlaubt keine zusätzlichen Rückschlüsse auf das typische Ausscheidungsverhalten konjugierter 2-Methoxyöstrogene. Während die Bestimmung bei der Schwangeren B.C. ab der 27. SSW bis auf einen leicht erhöhten Wert in der 37. Woche keinen weiteren Anstieg in der 2-Methoxyöstrogenausscheidung erkennen läßt und somit der Bestimmung des Gesamtkollektivs ent-

spricht, zeigt sich bei der Schwangeren A.G. ein Anstieg bis zum Termin. Bei beiden Schwangerschaften ergibt sich hinsichtlich des Konzentrationsmusters ein paralleles Verhalten zu den entsprechenden Serumkonzentrationen.

Serum- und Urinkonzentrationen der 2-Methoxyöstrogene gesunder schwangerer Frauen weisen offensichtlich im Verhältnis zu den Gesamtöstrogenen eine breitere physiologische Streuung auf. Mehrere Untersucher kommen zu ähnlichen Ergebnissen (4, 19, 21, 25, 39). Verschiedene Gründe dieses unterschiedlichen Verhaltens werden diskutiert.

Als Ursache wird eine schilddrüsenabhängige, unterschiedliche Ring A - Hydroxylierungsrate vermutet (31). Andererseits könnten auch unterschiedliche Methylierungs- oder Demethylierungsraten (39) der Catecholöstrogene eine wesentliche Rolle spielen.

Weniger berücksichtigt wurde bisher die Parallelität der Konzentrationsverläufe von Catecholöstrogenen und Östron im Serum und im Urin. Catecholöstrogene entstehen hauptsächlich durch Hydroxylierung von Östron und spiegeln vermutlich aus diesem Grund ein sehr ähnliches Verlaufs- und Ausscheidungsmuster wider.

Allerdings bedeutet diese Erklärung nur eine Verschiebung der Problematik, da auch die Plateaubildung und die breite Streuung der Östron-Ausscheidung im letzten Schwangerschaftsdrittel ungeklärt sind. Hier wird eine Steigerung der 16α Hydroxylierung durch die fetale Leber und Nebennierenrinde in den letzten Schwangerschaftswochen als mögliche Ursache diskutiert (4). Eine entsprechende Streuung und Plateaubildung von Östradiol wird jedoch nicht beobachtet (12, 27).

Tabelle 4 Serumkonzentrationen freier 2-Methoxyöstrogene

Autor	Gruppe	M $\pm$ SD bzw. Median, (10. - 90. Perzentile)		n
		pg/ml		
Emons et al. (23)	Männer (21-40 Jhr)	74 $\pm$	13	6
	Männer (51-70 Jhr)	109 $\pm$	44	6
	Postmenopause	102 $\pm$	26	7
	Follikelphase	96 $\pm$	19	6
	Perioovulation	181 $\pm$	27	6
	Lutealphase	152 $\pm$	22	6
	21. - 30. SSW	3980 $\pm$	1030	20
diese Arbeit	Männer (19-78 Jhr)	< 16,9		25
	Postmenopause	37 $\pm$	17	10
	Follikelphase	47 $\pm$	13	25
	Perioovulation	106 $\pm$	18	12
	Lutealphase	72 $\pm$	15	25
	21. - 24. SSW	3001	(939-4260)	13
	25. - 28. SSW	3079	(1167-5557)	20
	33. - 36. SSW	3116	(1772-6802)	22
	37. - 40. SSW	3624	(2218-6334)	34

zum Vergleich: Serumkonzentrationen freier 2-Hydroxyöstrogene

Berg et al. (14)	Männer	29 $\pm$	5	11
	Postmenopause	13 $\pm$	3	10
	Follikelphase	32 $\pm$	8	25
	Lutealphase	53 $\pm$	13	24
	23. - 25. SSW	127 $\pm$	19	14
	32. - 34. SSW	213 $\pm$	33	17
	38. - 40. SSW	240 $\pm$	23	24

Tabelle 5 Urinkonzentrationen konjugierter 2-Methoxyöstrogene

Autor	Gruppe	M $\pm$ SD bzw. M und Bereich $\mu\text{g}/24$ Std.	n
Hobkirk	15. - 19. SSW	60 (25-140)	10
et al.	20. - 24. SSW	130 (30-360)	18
(39)	25. - 29. SSW	180 (60-490)	18
	30. - 34. SSW	230 (60-610)	18
	35. - 40. SSW	320 (40-950)	14
Cohen	3. Trimester	310 (200-1000)	keine
et al. (19)			Angabe
Adlercreutz	38. - 40. SSW	70	10
et al. (4)			
Ball	Männer (21-40 Jhr)	12,9 $\pm$ 4,6	10
et al. (10)	Männer (51-70 Jhr)	9,5 $\pm$ 3,5	10
	Postmenopause	9,0 $\pm$ 3,5	10
	Follikelphase	14,2 $\pm$ 6,6	7
	Perioovulation	22,6 $\pm$ 7,5	7
	Lutealphase	16,4 $\pm$ 8,7	7
	11. - 20. SSW	141 $\pm$ 42	4
	21. - 30. SSW	239 $\pm$ 150	4
	31. - 40. SSW	449 (145 - 1150)	4
diese Arbeit	Männer (22-64 Jhr)	6,1 $\pm$ 1,8	10
	Postmenopause	6,2 $\pm$ 1,9	10
	Follikelphase	8,2 $\pm$ 2,3	78
	Perioovulation	14,0 $\pm$ 6,6	26
	Lutealphase	11,1 $\pm$ 4,2	92
		Median, (10. -90. Percentile)	
	13. - 16. SSW	107,5 (36,7-200,6)	21
	25. - 28. SSW	199,2 (84,1-420,0)	16
	37. - 40. SSW	201,0 (94,6-413,5)	23

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung von 2-Methoxyöstrogenen im Serum und im Urin bei gesunden Männern und Frauen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen beschrieben.

Hohe Empfindlichkeit des hierfür angewandten Radioimmunoassays wurde durch die Verwendung eines heterologen Brückensystems von Immunogen und Indikatorhaptan erreicht.

Die Reagenzien-Leerwerte lagen bei 16,9 pg/ml (Bestimmung im Serum) bzw. bei 0,2 ng/ml (Bestimmung im Urin).

Spezifität, Richtigkeit und Präzision der Methode entsprachen den an einen Radioimmunoassay gestellten Anforderungen.

Folgende Ergebnisse wurden bei der Bestimmung der 2-Methoxyöstrogene im Serum und im Urin ermittelt.

	freie 2-Methoxyöstrogene im Serum M $\pm$ SD pg/ml	n.	konjugierte 2-Methoxyöstrogene im Urin M $\pm$ SD ng/mg Kreatinin	n
Männer	< 16,9	25	3,84 $\pm$ 1,17	10
Postmenopause	37 $\pm$ 17	10	5,13 $\pm$ 1,65	10
Follikelphase	47 $\pm$ 13	25	6,87 $\pm$ 1,92	78
Perioovulation	106 $\pm$ 18	12	11,67 $\pm$ 5,50	26
Lutealphase	72 $\pm$ 15	25	9,30 $\pm$ 3,51	92

	freie 2-Methoxyöstrogene im Serum		konjugierte 2-Methoxyöstrogene im Urin	
	Median (10.-90.Percentile)	n	Median (10.-90.Percentile)	n
Schwangerschaft	pg/ml		ng/mg Kreatinin	
9. - 12. SSW	460 (239-1169)	37	45,1 (18,1- 87,7)	9
25. - 28. SSW	3079 (1167-5557)	20	166,0 (70,1-350,0)	16
37. - 40. SSW	3624 (2218-6334)	34	167,5 (78,8-344,6)	23

freie 2-Methoxyöstrogene im Serum

Median und Bereich

	pg/ml		n
Mütter a. Termin	3 275	(1 432 - 6 379)	28
Neugeborenes	1 359	(533 - 2 487)	28
V. umbilicalis	741	(407 - 1 179)	5
A. umbilicalis	346	(279 - 458)	8

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abraham, G. E. and Grover, P. K.
In 'Principles of competitive protein binding assay'
(Odell, W. D. and Daughaday, W. H., eds.)
Lipincott, Philadelphia, 140 - 157, (1971)
2. Adashi, E. Y., Caspar, R. F., Fishman, J. and Yen, S.S.C.
Stimulatory effect of 2-hydroxyestradiol on prolactin release
in hypogonadal women.
Journal of Clinical Endocrinol. and Metabolism 51, 413 - 415,
(1980)
3. Adashi, E. Y., Rakoff, J., Divers, W., Fishman, J. and
Yen, S.S.C.
The effect of acutely administered 2-hydroxyestrone on the
release of gonatropin and prolactin before and after estrogen
priming in hypogonadal women.
Life Sciences 25, 2051 - 2055, (1979)
4. Adlercreutz, H. and Luukkainen, I.
Identification and determination of oestrogens in various
biological materials in pregnancy.
Annals of Clinical Research 2, 365 - 380, (1970)
5. Allen, R. and Redshaw, M. R.
The use of homologous and heterologous ¹²⁵I-radioligands
in the radioimmunoassay of progesterone
Steroids 32, 467 - 486, (1978)
6. Ball, P., Emons, G., Haupt, O. Hoppen, H. O. and Knuppen, R.
Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone
Steroids 31, 249 - 257, (1978)

7. Ball, P., Farthman, E. and Knuppen, R.
Comparative studies on the metabolism of oestradiol-17 β and 2-hydroxyoestradiol-17 β in man in vitro and in vivo
J. Steroid Biochem. 7, 139 - 143, (1976)
8. Ball, R. Knuppen, R., Haupt, M. and Breuer, H.
Interactions between estrogens and catechol amines.
III. Studies on the methylation of catechol estrogens, catechol amines and other catechols by the catechol-O-methyltransferase of human liver.
J. Clin. Endocrinol. and Metabolism 34, 736 - 746, (1972)
9. Ball, P., Naish, S. and Naftolin, F.
Catecholestrogens and the induction of sexual receptivity in the ovariectomized rat
Acta Endocrinol. Supp. 234, 94, 103, (1980)
10. Ball, P., Reu, G., Schwab, J. and Knuppen, R.
Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone and 2-methoxyestrone in human urine
Steroids 33, 563 - 576, (1979)
11. Ball, P., Stubenrauch, G. and Knuppen, R.
Metabolism of 2-methoxy- and 4-methoxyestrone in man in vivo
J. Steroid Biochem. 8, 989 - 993, (1977)
12. Berg, D.
Persönliche Mitteilung, (1983)
13. Berg, D., Sonsalla, R. and Kuss, E.
Concentrations of 2-methoxyoestrogens in human serum measured by a heterologous immunoassay with an ¹²⁵J-labelled ligand
Acta Endocrinol. 103, 282 - 288, (1983)

14. Berg, D., Thaler, F.X. and Kusa, E.
Concentrations of 2-hydroxyestrogens in human sera measured by a heterologous immunoassay with an ^{125}J -labelled ligand.
Acta Endocrinol. (Copenh.) 100, 154 - 160, (1982)
15. Breuer, H. and Knuppen, R.
Biogenese von 2-Methoxyöstradiol-(17 β) in der menschlichen Leber.
Naturwissenschaften 47, 20 - 25, (1968)
16. Breuer, H., Knuppen, R. and Haupt, O.
Effect of 2-substituted estrogens on the enzymatic methylation of catecholamines in human liver.
Biochem. J. 118, 9P, (1970)
17. Breuer, H., Lubrich, W. and Knuppen, R.
Wirkung von phenolischen Steroiden auf die Methylierung von Brenzkatechinaminen.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie 349, 3, (1968)
18. Cantorall, E. W., Bernstein, S. and Cekleniak, W.
Hypercholesterolemia treatment
Chem. Abs. G2, 1522 c, (1965)
19. Chatteraj, S. C., Fanous, A. S., Cecchini, D. and Lowe, E. W.
A radioimmunoassay method for urinary catechol estrogens
Steroids 31, 375 - 391, (1978)
20. Chesley, L. C., Talledo, E., Bohler, C. S. and Zuspan, F. P.
Vascular reactivity to angiotensin II and norepinephrine in pregnant and nonpregnant women
Am. J. Obstet. Gynecol. 91, 837 - 842, (1965)

21. Cohen, S. L., Suzuki, Ho. P. and Alspector, F. E.
The preparation of pregnancy urine for an estrogen profile
Steroids 32, 279 - 293, (1978)
22. Corrie, J. E. T. , Ratcliffe, W. A. and Macpherson, J. S.
Generally applicable ¹²⁵Iodine-based radioimmunoassays
for plasma progesterone.
Steroids 38, 709 - 717, (1981)
23. Dicsfalussy, E., Mancuso, S.
Oestrogen metabolism in pregnancy
In Foetus and Placenta, Oxford (1969)
24. Dunn, J. F., Merriam, G. R., Eil, Ch., Kono, S., Loriaux,
D. L. and Nisula, B. C.
Testosterone-estradiol binding globulin binds to
2-Methoxyestradiol with greater affinity than to
testosterone
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,
404 - 406, (1980)
25. Emons, G., Bell, P., v. Postel, G. and Knuppen, R.
Radioimmunoassay for 2-Methoxyestrone in human plasma
Acta Endocrinol. 91, 158 - 166, (1979)
26. Erlanger, B. F., Borek, F., Beiser, S. M. and Liebermann, S.
Steroid - Protein Conjugates
II. Preparation and characterization of conjugates of
bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone
and estrone.
J. Biolog. Chem. 234, 1090 - 1094, (1959)
27. Fischer-Rasmussen, W.
Plasma oestrone in normal human pregnancy
J. Steroid Biochem. 2, 371 - 376, (1971)

28. Fishman, J., Boyar, R. M. and Hellman, L.
Influence of body weight on estradiol metabolism in young women
Clin. Endocrin. Metabol. 41, 989 - 991, (1975)
29. Fishman, J. and Gallagher, T. F.
2-Methoxyestriol: A new metabolite of estradiol in man
Arch. Biochem. Biophys. 77, 511 - 513, (1958)
30. Fishman, J., Hellmann, L., Zumoff, B. and Gallagher, T. F.
Influence of thyroid hormone on estrogen metabolism in man
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 22, 389, (1962)
31. Fishman, J. Norton, B. I. and Krey, L.
2-hydroxylation of estrogens in the brain participates in the initiation of the preovulatory LH surge in the rat.
Biochem. and Biophys. Res. Commun. 93, 471, (1980)
32. Fishman, J. and Tulchinsky, D.
Suppression of prolactin secretion in normal young women by 2-hydroxyestrone
Science 210, 73 - 74, (1980)
33. Gelbke, H. P., Böttger, M. and Knuppen, R.
Excretion of 2-hydroxyestrone in urine throughout human pregnancies
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 41, 744 - 750, (1975)
34. Gelbke, H. P. and Knuppen, R.
A new method of preventing oxidative decomposition of catechol estrogens during chromatography
J. Chromatogr. 71, 465 - 471, (1972)

35. Gethmann, U., Ball, P. and Knuppen, R.
Effect of 2-hydroxyestrone on gonadotropin secretion
in the ovariectomized rat
Acta Endocrinol. Suppl. 215, 102, (1978)
36. Gethmann, U. and Knuppen, R.
Effect of 2-hydroxyestrone on lutropin (LH) and follitropin
(FSH) secretion in the ovariectomized rat
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 357, 1011 - 1013, (1976)
37. Givner, M. L., Bauld, W. S. and Vagi, K.
A chemical method for the quantitative determination
of 2-methoxyoestrone, oestrone, ring D α -ketolic oestrogens,
oestradiol-17 β , 16-epi-oestriol and oestriol in human urine
Biochem. J. 77, 406 - 415, (1960)
38. Hobkirk, R., Ph. D. and Nilsen, M.
Observation on the occurrence of six estrogen fractions in
human pregnancy urine. II. Diabetic Pregnancy
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 22, 134 - 141, (1962)
39. Hobkirk, R., Ph. D. and Nilsen, M.
2-Methoxyestrone as an estrogen metabolite in the human
subject
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 23, 274 - 278, (1963)
40. Knuppen, R., Höllner, M. Tillmann, D. and Breuer, H.
Wirkung von Östrogenen auf den Abbau und Methylierung
von Adrenalin bei der Maus in vivo
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1301 - 1309, (1969 b)
41. Knuppen, R., Lubrich, W. Haupt, O., Ammerlahn, U. and
Breuer, H.
Beeinflussung der enzymatischen Methylierung von Catechol-
aminen durch Östrogene und vice versa.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 1209, 1301 - 1309,
(1969 a)

42. Kono, S., Brandon, D., Merriam, G. R., Loriaux, D. L.
and Lipsett, M. B.
Low plasma levels of 2-hydroxyestrone are consistent with
its rapid metabolic clearance.
Steroids 36, 463 - 471, (1980)
43. Lloyd, T. and Weisz, I.
Direct inhibition of Tyrosine hydroxylase activity by
catechol estrogens
J. Biol. Chem. 253, 4841 - 4843, (1978)
44. Luttge, W. G. and Jasper, T. W.
Studies on the possible role of 2-hydroxyestradiol in the
control of sexual behaviour in female rats
Life Science 20, 419 - 426, (1977)
45. Marks, F. and Hecker, E.
Beziehungen zwischen Östrogenstoffwechsel und Lipidper-
oxidation in Rattenlebermikrosomen
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 523 - 532, (1968)
46. Marrone, B. L., Rodriguez-Sierra, J. F. and Feder, H. H.
Role of catechol estrogens in activation of lordosis in
female rats and guinea pigs
Pharmacol. Biochem., Behav. 7, 13 - 17, (1977)
47. Martucci, Ch. and Fishman, J.
Direction of estradiol metabolism as a control of its hor-
monal action - uterotrophic activity of estradiol metabolites
Endocrinology 101, 1709 - 1715, (1977)
48. Martucci, Ch. and Fishman, J.
Impact of continuously administered catechol estrogens on
uterine growth and LH-secretion
Endocrinology 105, 6, 1288 -1292, (1979)

49. Naftolin, F., Morishita, H., Davies, I. J., Todd, R., Ryan, K. J. and Fishman, J.
2-hydroxyestrone induced rise in serum LH in the immature male rat
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 905 - 910, (1975)
50. Patt, V. Möllering, M. and Breuer, H.
Beeinflussung der Blutlipide bei der Ratte durch 2-oder-4-substituierte Östrogen-Derivate.
Arzneim. Forsch. 21, 308 - 310, (1971)
- 51a Richterich, R.
Zuverlässigkeit von Labormethoden und Qualitätskontrolle
In klin. Chemie 3.Auflage, Basel, 66 - 74, (1971)
- 51b Richterich, R.
Urinsammlung
In klin. Chemie 3.Auflage, Basel, 100 - 102, (1971)
- 52a Rick, W.
Analytik im Laboratorium
Klin. Chemie und Mikroskopie 5. Auflage, Berlin, 7, (1977)
- 52b Rick, W.
Analytik im Laboratorium
Klin. Chemie und Mikroskopie 5. Auflage, Berlin, 392, (1977)
53. Scatchard, G.
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. N. Y., Acad. Sci, 51, 660 - 672, (1949)
54. Schaeffer, J. M. and Hsueh, A.J.W.
2-hydroxyestradiol interaction with dopamin receptor binding
in rat anterior pituitary

- Journal of Biological Chemistry 254, 5606 - 5608, (1979)
55. Schinfeld, J. S., Tulchinsky, D., Schiff, I. and Fishman, J.
Suppression of prolactin and gonadotropin secretion in
postmenopausal women by 2-hydroxyestrone
Journal of Clinical Endocrinol. and Metabolism 50, 408 - 410,
(1980)
56. Westerfeld, W. W.
The inactivation of oestrone
Biochem. J. 34, 51 - 58, (1940)
57. Wotiz, H. H. and Chatteraj, S. C.
Determination of estrogens in low and high titer urines
using thin layer and gas liquid chromatography
Anal. Chem. 36, 1466 - 1472, (1964)
58. Yoshizawa, I. and Fishman, J.
Radioimmunoassay of 2-hydroxyestrone in human plasma
J. Clin. Endocrinol. Metab. 32, 3 -6, (1971)
59. Zumoff, B., Fishman, J. Gallagher, T. F. and Hellmann, L.
Estradiol metabolism in cirrhosis
J. Clin. Invest. 47, 20 - 25, (1968)

DANKVERMERK

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. E. Kuß für die Überlassung des Themas, die Gelegenheit in seinem Labor zu arbeiten und das stets wohlwollende Interesse.

Herrn Prof. Dr. J. Zander danke ich für die Möglichkeit in seiner Klinik zu promovieren.

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. D. Berg für die freundliche Unterstützung und die wertvollen Anregungen.

Frl. G. Lautenbacher danke ich für die Anleitung zum Arbeiten in einem klinisch chemischen Forschungslabor.

Frau Petra Dietrich danke ich für die sorgfältige Anfertigung des Manuskripts.

LEBENS LAUF

Reinhard Sonsalla	geboren am 24.7.1950 in Debisfelde, Kreis Klötze als Sohn des Kraftfahrzeugingenieurs Heinz Sonsalla und seiner Ehefrau Gertrud Sonsalla, geborene Neuber.
Schulbildung	Volksschule Traunstein von 1956 - 1961 Holbein - Gymnasium Augsburg von 1961 - 1970 Abschluß: Reifeprüfung 1970
Studium	Ludwig - Maximilians Universität München Sport und Geographie von 1971 - 1975 8 Sem.
Bisherige Tätigkeit	Nationaltrainer der Olympia - Mannschaft von Grenada W.I. Schwimmen und Leichtathletik 1975 - 1978
Studium	Grenada Medical School Studium der Medizin 1978 1 Sem. Ludwig - Maximilians Universität München Studium der Medizin 1978 - 1984 12 Sem.

